

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

EX VIVO ADHERENS SEJTKULTÚRÁK OKULÁRIS BETEGSÉGEK MODELLEZÉSÉHEZ, KARAKTERIZÁLÁSÁHOZ ÉS GYULLADÁS TANULMÁNYOZÁSÁHOZ

Natasha Josifovska, M.Sc.

Témavezető:

Prof. Dr. Goran Petrovski, MD, PhD, Dr. med.habil.



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
SZEMÉSZETI KLINIKA**

SZEGED, 2017

Ex vivo adherens sejt kultúrák okuláris betegségek modellezéséhez, karakterizálásához és gyulladás tanulmányozásához

Natasha Josifovska (M.Sc.)

Témavezető: Prof. Dr. Goran Petrovski, MD, PhD, Dr. med.habil.

Szegedi Tudományegyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, SzTE
ÁOK Szemészeti Klinika

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Zsuzsanna Bata, DSc
(SzTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai
Klinika)

Tagok:

Dr. Miklós Resch, PhD
(SE ÁOK Szemészeti Klinika)

Dr. Ernő Zádor, DSc
(SzTE ÁOK Biokémiai Intézet)

A bíráló bizottság elnöke:

Dr. Márta Széll, DSc
(SzTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet)

Opponensek:

Dr. Tamás Csont, PhD
(SzTE ÁOK Biokémiai Intézet)

Dr. Adrienne Csutak, PhD
(DE KK Szemklinika)

Tagok:

Dr. Miklós Resch, PhD
(SE ÁOK Szemészeti Klinika)

Dr. Éva Csősz, PhD
(DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai
Intézet)

A szemet, legfontosabb érzékszervünket, a külső környezettől, anyagoktól a boltozatos alakja, szegmensekre tagolt stuktúrája, ellenáló epithéliumja, könnyelválasztása és az okuláris elvezető csatornák védik. A szem két nagyobb részre osztható, az elülső szegmensre, amely a kisebbik régió és a szaruhártya (cornea), kötőhártya (conjunctiva), írisz (szivárványhártya)-ciliáris test (sugártest) (ICB), lencse és csarnokvíz alkotják, valamint a hátulsó szegmensre. Ide tartozik az ínhártya (sclera), érhártya (chorioida) és az ideghártya (retina), amelyet a szemcsarnok ölel körül és az üvegtest tölt ki.

A kötőhártya egy átlátszó, mukózus réteg, amely a szemhéjak belső felszínét és a szemgolyó elülső, külső részét fedi, a cornea- limbális határig. Ez a nyirokerekkel sűrűn átnőtt szövet, bővelkedik immunsejtekben. A szaruhártya és a kötőhártya határán helyezkedik el a limbus, mely epithél sejteket és ezek progenitorjait tartalmazza, mintegy határként szolgálva a conjunctiva növekedésének.

A pterygium (kúszóhártya) a pathológiás bulbáris conjunctiva háromszögletes-alakú, fibrovaszkuláris, subepitheliális ráhúzódnak a limbális régióon keresztül a szaruhártyára, amely aggresszív és vaszkularizált. Feltehetőleg aktivált, osztódó limbális epitheliális őssejtekből (LESC) származik. A betegség pontos pathomechanizmusa nem ismert, nagy valószínűséggel az ultribolya (UV) fény szerepet játszik a kialakulásában. Ritka esetekben a pterygium a pupilláris tengelyre húzódik és vakságot okozhat.

A krisztallin lencse fényáteresztő és fókuszáló képességéhez a sejtek és proteinek speciális elrendeződésben, kompartmentekben fejlődtek ki. A lencse átlátszó, vérerektől és idegektől mentes, születéskor. Epithél sejtektől differenciált hosszú, lencserostokból épül fel, melyek a szövet anterior végétől a posteriorig érnek. A lencsetok egy elasztikus, képlet, amely magába foglalja a fejlődő, differenciáló sejteket, az epithélium anterior és ekvatoriális részét, egy perifériás kortikális régiót, valamint egy belső magot. Az életkor előrehaladtával a lencse mérete megnő és elveszti a rugalmasságát.

Ex vivo modellek kidolgozása szükséges különböző, a szemet érintő betegségek, pterygium, szürkehártya és proliferatív diabetikus retinopathiából (PDR) származó fibrovaszkuláris epiretinális membránok (fveRM) pathomechanizmusának, gyulladásos folyamatainak és lehetséges kezelésének a tanulmányozásához. Jelen tanulmányban egy új, egyszerű és könnyen reprodukálható módszert dolgoztunk ki, mely emberi, műtéti úton eltávolított mintákat és viskoelasztikus anyagot, mint sejtdhézió-segítő anyagot alkalmaz, az előbbi betegségekből származók mintákból történő sejt kultúrák létrehozásához.

A kúszóhártya a szemfelszín betegsége, amely feltehetőleg krónikus UV expozíció miatt alakul ki, és gyulladásos állapot, proliferáció, fibrózis, angiogenesis és extracelluláris- mátrix lebomlás jellemzi. Centripetális szövet növekedés, gyulladás és neovaszkularizáció is kíséri a folyamatot. A pterygium kialakulása nem teljesen tisztázott, viszont egyre több kutatási eredmény áll rendelkezésre a pathogenesis mechanizmusának feltárásához. A legújabb kutatások szerint a pterygium kialakulása és növekedése kapcsolatban van az epithélium proliferációjával és a fibrovaszkuláris réteggel is, tehát a kúszóhártya feltehetőleg kontrollálatlan sejtszétválás eredménye.

Már korábban tanulmányozták és leírták a Ki-67 proliferációs marker emelkedett expresszióját pterygium sejtekben, a normális kötőhártya sejtekhez viszonyítva. A pterygium kialakulásában

az SDF-1/ CXCR4 útvonalnak is szerepe van, mégpedig az angiogenezisben, vaszkuláris endothél sejt migrációban és proliferációban.

Az UV-B sugárzás oxidatív DNS károsodást okoz és a kúszóhártya kialakulásának és kiújulásának legvalószínűbb oka, ezért fontos az antioxidáns védelem felállítása és fenntartása primer pterygium- operált betegeknél. A 8-OHdG, az oxidatív DNS károsodás legjobb markere, magasabb expressziót mutatott a primer pterygium „fejében”, az egészséges kötőhártyához viszonyítva. A Hypoxia- indukált faktor HIF- 1α fontos szerepet játszik a sejt túlélésében és metabolizmusának regulációjában, valamint magas expressziója összejszerű sejtekben is ismert. A HIF- 1α és a hősokk proteinek kölcsönösen aktiválódnak a pterygiumban, valamint upregulációjuk jelentheti a sejteket alkalmazkodását a megváltozott körülményekhez.

A napfény által okozott oxidatív stressz indukálhat növekedési faktor kibocsátást, angiogenezist, krónikus gyulladást és kollagenolízist is. Miután a napfény hatására megindul a pterygium kialakulása, a proliferáló fibroblasztok reaktív oxigéngyököket (ROS) termelhetnek, hosszú lefutású gyulladásos folyamatokat indítva. Az UV fény emellett az epithél sejteket is aktiválhatja a limbus környékén, melyek IL6 és IL-8 termeléssel válaszolva mediálják a gyulladást, proliferációt, angiogenezist és anti-apoptózist. Az Interleukin 1, 6 és 8 mind megemelkedik UV- B expozíció hatására, más gyulladásos mediátorokat és mátrix metalloproteinázokat aktiválva, így elősegítve az állapot kialakulását.

Műtéti beavatkozások után gyűjtött pterygiumot hosszú ideig ex vivo tenyésztve (3 hónap) elértük annak 3 dimenziós stratifikációját. A többrétegű képletből kinyert sejtek felszíni fehérjéinek elemzését végeztük el, hematopoetikus- és mesenchymális őssejtek markereket keresve, valamint a sejtek eredetének meghatározására. A sejtek immunhisztokémiás vizsgálata is megtörtént pluripotens-, oxidatív stressz-, őssejtszerű-, migrációs-, proliferációs-, epithél- és szekretorikus markereket jelölve. Ezen kívül az anti-proliferatív Mitomycin C, pro-inflammatorikus citokinekre (IL-6, IL-8) kifejtett hatását is vizsgáltuk.

A pterygiumból 3D kinövő sejtek magas migrációs- (CXCR4) és szekretorikus- (MUC1, MUC4), valamint oxidatív stressz (8-OHdG) marker expressziót mutattak, viszont a hypoxia (HIF- 1α) és proliferációs (Ki-67) markerek alacsony szintet. Közepes és alacsony expressziót figyeltünk meg pluripotens markerek (Vimentin és Δ Np63) jelölésénél, míg a feltételezett őssejtszerű- (Sox2, Oct4, ABCG-2) és epithél sejt markerek (CK19, CD8- 18) gyenge jelet produkáltak. A sejtfelszíni analízis szerint magas volt a hematopoetikus CD47, mesenchymális CD73 és CD90 expresszió, viszont csökkent a CD34 és CD105, valamint a progenitor CD117 és adhézíós proteinek kifejeződése a sejteken. A 3D kinövő sejtekből ex vivo alacsony IL-6 és IL-8 elválasztást mértük, amelyet képesek voltunk gátolni Mitomycin C kezeléssel.

Az 3D szövettenyésztéssel nyert pterygium különböző eredetű és szövetvonalú (lineage) sejtek alkotják és alkalmas betegségmodell az állapot pathogenezisének tanulmányozására ex vivo, lehetőséget kínálva új kezelési és megelőzési módszerek kidolgozására.

A kalcium fontos szerepet játszik a lencse epithélium a sejtátviteli folyamataiban, annak fiziogiás szabályozása rendkívül fontos, mivel az állapot felborulásával szürkehályog alakulhat ki a lencsén. Kísérleti körülmények között már egy, mechanikailag stimulált sejt is képes az intercelluláris Ca^{2+} hullám, és így konfluens sejtrétegek sejtátvitelének elindítására.

A szem szöveteit érhetik különböző citokinek és egyéb pro- inflammatorikus anyagok, melyek sérülés, infekció, vagy betegségek következményeként választódnak ki, így a lencsére is hatással lehetnek inflammatorikus mediátorok, például a csarnokvízben található bakteriális infekció miatt.

TNF α -val és egyéb citokinekkel inkubált humán lencse epithél sejtekben (LEC) megnő a NF- κ B (egy gyulladással indukálható transzkripció faktor) - amely citotoxicitást és apoptózist okoz. Aldóz reduktáz (AR) inhibitorokkal gátolva, visszafordítható lenne a NF- κ B- indukált LEC sejthalál. Szürkehályog műtét- után visszamaradt LECK feltehetőleg IL- 1-et, IL- 6-ot és a fibroblaszt növekedési faktort (b-FGF) választanak ki *in vivo*, így posztoperatív gyulladást, LEC proliferációt indítva.

PDR során kialakuló fvERM-ek kifejthetnek a retinára trakciós erőt így retinaleválást okozva. A fvERM-ben található sejtek mechanikai stimulációja válhat ki intercelluláris Ca²⁺ ion hullámot, a sejt kalciumraktáraiból való kiáramlással. Ezek a hullámok nem okoznak membránpotenciál- változást, viszont egyéb, extraneuronális jelátviteli folyamatokat elindíthatnak.

A makrofágok és neutrophilek által kiválasztott IL- 6, IL- 8 és TNF α fontos pro-inflammatorikus citokinek, szintjük PDR betegek üvegtesti folyadékában megemelkedik. Ebből látható a gyulladásos citokinek fontos szerepe az angiogenezisben, PDR betegekben és a folyamat teljes feltárásával új diagnosztikai és terápiás célpontokat találhatunk a betegség kezeléséhez, megelőzéséhez.

Szürkehályog műtét után, a lencse anterior részén található LECK (aLC- LEC) és PDR miatt indikált vitrektómiából származó fvERM-eket gyűjtöttünk és tenyésztettünk 2D- monolayer sejt kultúrákban. Mechanikailag és acetilkolin (ACh) stimuláltuk aLC- LECK-et, majd a kalcium- szinteket mérjük, míg az fvERM sejteken gyulladásos vizsgálatokat végeztünk.

A mechanikailag és ACh- stimulált aLC- LECK aktív kalcium-indukált jelátvitelt mutattak, a sejtfelszíni ACh receptorok közreműködésével. Az fvERM-ből kinövő sejtek gyulladásos választ produkáltak TNF α kezelésnek köszönhetően, amely *ex vivo* modellként alkalmazható lehet az *in vivo* végbemenő PDR és gyulladás tanulmányozására.

Összegezve elmondható, hogy a tanulmányban viszkoelasztikus anyagot, mint új és egyszerű módszert használtunk különböző szövetek adhéziójának segítésében és sejtenyésztéshez, valamint a humán kúszóhártya explantátumok képesek az eredetihez hasonló, 3D stratifikált struktúrák létrehozására, melyek proliferáló, migráló sejteket tartalmaznak. Ezek sejtfelszíni markereik alapján differenciálatlan állapotúak, viszont epithél irányú elköteleződésűek. A 3D struktúrák manipulálása, kezelése hasonló volt az eredeti szövethez, így azok feltehetőleg használhatóak lennének gyógyszerkutatási, 3D szövettenyésztési eljárásokban. Az aLC LECK-en végeztünk mechanikai stimuláció hatására végbemenő intercelluláris kalcium dinamikai vizsgálatokat, ACh- indukált sejt-sejt kommunikációt és kalcium jelátvitelt, valamint gyulladásos citokin kibocsátást is mértünk. A jövőben, a sejtek funkcionalitásának és homeosztázisak vizsgálata kalciumszint méréssel és gyulladásos markerek mérésével új lehetőségeket nyithat farmakológiai és sejterápiás eljárások kidolgozásához szemészeti betegségek kezeléséhez.